

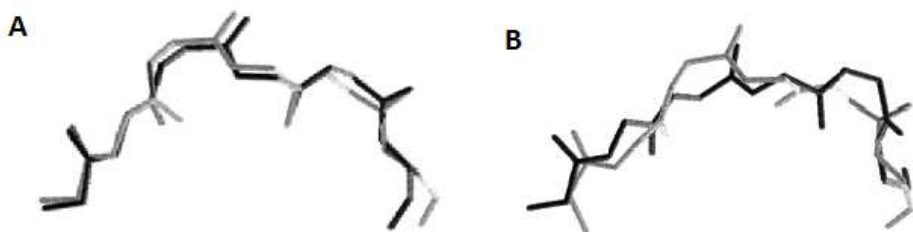
VÁLTOZATOK EGY TÉMÁRA: A REVERZÍBILIS
SZERIN PROTEÁZ INHIBITOROK SZERKEZETI SOKFÉLESÉGE

ELTE Eötvös József Collegium

Bevezetés

A szerin proteázok az élővilág fontos fehérjebontó enzimei; ehhez a csoport-hoz tartoznak az emésztésben fontos szerepet játszó tripszin, a kimotripszin és az immunrendszer részét képező MASP fehérjék is. A szerin proteázokat gátló molekulák egyik csoportja a reverzibilis szerin proteáz inhibitorok. (Gátlási mechanizmus alapján megkülönböztetünk még nem-kanonikus szerin proteáz inhibitorokat és szerpineket.) A reverzibilis szerin proteáz inhibitoroknak kulcsszerepük van a proteázok aktivitásának szabályzásában, csökkent termelésük sokszor súlyos betegségekhez vezet. Az alfa₁-proteáz inhibitor hiányakor a proteáz lebontja a tüdőhólyagocskák közötti szeptumokat és ezzel emfizémiát, tüdőtágulatot okoz. Bizonyos százalékban a hasnyálmirigyben termelt tripszinogén már a hasnyálmirigyben tripszinné alakul, SPINK-1 (Serine protease inhibitor Kazal-type-1) hiányában a tripszin elkezdi megemésztetni a hasnyálmirigy szöveteit és hasnyálmirigy-gyulladást okoz [1]. Ebből is látszik, hogy mennyire fontos szerepük van a szerin proteáz inhibitoroknak. Azonban nem csak fontos fiziológiai szerepük miatt lettek nagyon népszerűek a kutatók körében, hanem amiatt is, mert egy nagyon érdekes alapkutatási kérdést vetnek fel: hogyan lehet egy fehérjemolekulával egy fehérjebontó enzimet annak szubsztrátkötő árkan keresztül gátolni.

A reverzibilis szerin proteáz inhibitorok csoportjába tartozó fehérjék 18, evolúciósan eltérő eredetű családba tartoznak. A különböző családok tagjai teljes szerkezetüket tekintve rendkívül különbözőek. Vannak köztük béta-lemezekből felépülő, kevert alfa-béta, alfa-helikális szerkezetű és másodlagos szerkezeti elemeket nem tartalmazó fehérjék is. Ennek ellenére a 18 család mindegyik inhibitor tagja rendelkezik egy közel azonos konformációjú kanonikus hurokkal (1. ábra), és ezzel a reaktív hurokkal gátolja a proteázokat.



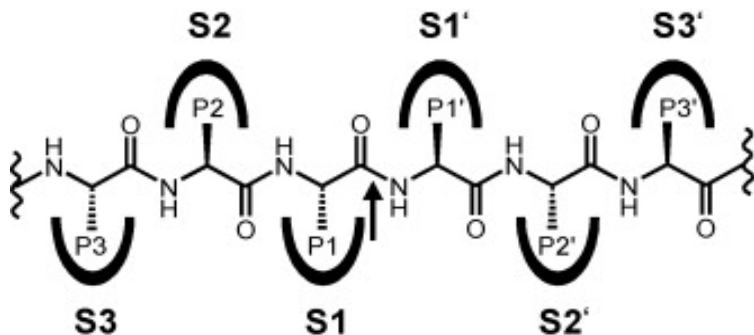
1. ábra: különböző családba tartozó inhibitorok reaktív hurkának egymásra vetítését láthatjuk. Az „A” ábrán a két leginkább hasonló, de különböző családba tartozó inhibitor, a SPINK-1 és a CI-2 (Chymotrypsin inhibitor-2) inhibitor kanonikus hurkának az egymásra vetítése látható. A „B” ábrán pedig a két leginkább különböző, nem azonos családba tartozó inhibitor, a BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitor) és az ecotin kanonikus hurkának egymásra vetítése látható [2].

Röviden bemutatom a Schechter–Berger-nómenklatúrát, amit a későbbiekben gyakran fogok alkalmazni. A proteáz a szubsztrátot (és néha az inhibitorot is) a P1 és P1’ aminosavak között hasítja. A hasítás során a proteáz katalitikus szerinje alakítja ki észterkötést a P1 aminosav karbonilszénatomjával. A P1 aminosavtól N-terminális irányba elhelyezkedő aminosavak P2, P3, P4, stb. csoportok, míg a P1’ aminosavtól C-terminális irányba elhelyezkedők a P2’, P3’, P4’, stb. csoportok. Az adott aminosavak oldalláncai a nekik megfelelő, „S” elnevezésű szubsztrátkötő zsebbel alakítanak ki kémiai kölcsönhatást. Tehát a P1’ csoport az S1’ szubsztrátkötő zsebbel, míg a P1 aminosav a S1 zsebbel (2. ábra).

A gátlási mechanizmus

A szerin proteáz gátlásában nagyon fontos szerepe van az inhibitor hurok rigiditásának, kimerevítettségének és konvex konformációjának. A proteáz-inhibitor reakciójának az egyenlete:





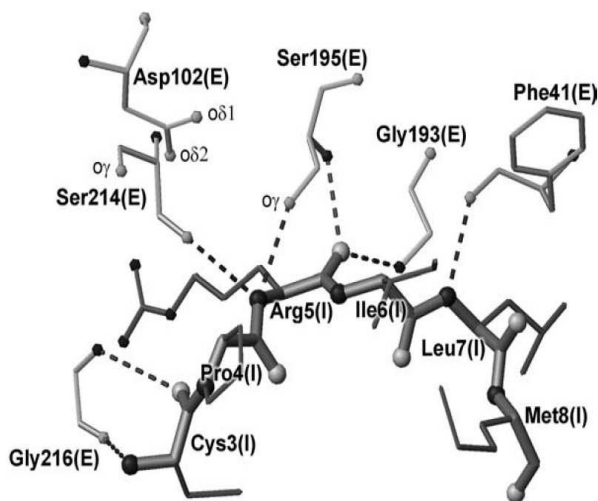
2. ábra: a Schechter-Berger nomenklatúrát szemléltető ábra.

Az ábrán az „S” jelzésű zsebek a proteázhoz tartoznak, míg a „P” jelzésű csoportok a szubsztrát vagy inhibitor molekulákhoz.

Az egyenletben az 'E' az enzimet (proteázt), az 'I' az inhibitor, míg a csillagozott E és I a hasított formákat jelöli. Az egyenletből is látszik, hogy egyensúly áll fenn az enzim-inhibitor komplex és a szabad enzim, valamint a szabad inhibitor állapotok között. Az egyensúly erősen el van tolva a komplexképződés irányába. A stabil enzim-inhibitor komplexben megtörténhet az inhibitor elhasítása, a szubsztráttal ellentétben ilyen esetben a komplex továbbra is stabil marad. A komplex kis K_d -vel disszociálhat, viszont ennél az eseménynél nagyobb valószínűséggel következik be az elhasított kötés reszintézise. A folyamat kulcslépése az, amikor a hasított inhibitor nem válik le a proteázról, hanem továbbra is képes a proteázzal stabil komplexet alkotni. Hogyan éri el az inhibitor, hogy gyorsan kialakulhasson egy nagyon stabil komplex, amiben csak kis valószínűséggel történik meg az inhibitor hasítása, és hogy a hasítás után is stabil maradjon a komplex?

A gyors komplexképződésben fontos szerepe van a konvex-konkáv illeszkedésnek. A konvex konformációjú reaktív hurok szinte tökéletesen, minimális konformációváltozás révén beleillik az enzim konkáv konformációjú aktív helyébe. Ez a geometriai illeszkedés nagyban hozzájárul a komplexképződés alacsony energiagátjához. A komplexet stabilizálják az inhibitor hurok és az enzim egyes aminosavai között kialakuló hidrogénkötések. Ezeket a hidrogénkötéseket az inhibitor részéről főláncsoportok alakítják ki, így minden egyes inhibitor-proteáz párnál kialakulnak (3. ábra). Ebből következik, hogy egy proteázt több inhibitor is képes gátolni, egy adott inhibítormolekula pedig több proteázt. Ennek ellenére nem képes egy adott reverzibilis szerin proteáz inhibitor az összes szerin proteázt gátolni, lévén, hogy a különböző proteázok S1 szubsztrátkötő zsebeinek jellege különböző, így például egy negatív oldalláncú P1-es csoporttal rendelkező inhibi-

tor nem tud stabil komplexet kialakítani egy negatív töltésű S1 szubsztrátkötő zsebbel rendelkező proteázzal [3]. Látható, hogy a komplex képződésében nagyon fontos szerepe van a P1-es aminosavnak, amelyet az inhibitor molekula a váz-hurok és hurok-hurok kölcsönhatásai révén egy kimerevített, „well exposed” helyzetbe kényszerít. Így mintegy odakínálja az inhibitor a P1-es aminosavát a proteáznak. A komplexképződés entrópiavezérelt, mivel a komplexképződés során hidrofób felszínek temetődnek el, a hidrofób felszínek körül a rendezett vízmolekulák újra rendezetlenné válhatnak.



3. ábra: Az enzim és az inhibitor között kialakuló hidrogénhidas kötések. Az ábrán az inhibitor hurok látható és azok az enzimhez tartozó aminosavak, amelyek fontosak a hidrogénhidak kialakításában. A szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket, a fekete gömbök a nitrogén atomokat, a szürkék az oxigén atomokat jelölik [4].

A rigid reaktív hurok miatt a hasításnak magasabb az energiagátja, mint a szubsztrát esetében. A hasítás tehát nagyon kis valószínűséggel történik meg, ráadásul a hasított inhibitor-proteáz komplex is nagyon stabil marad. Ennek egyik oka, hogy hasítás után nem távolodik el egymástól a C- és N-terminális termék, mert a hurok mindkét vége peptidkötésekkel kapcsolódik a vázhoz, mivel egy fehérjelánc. Ennek következtében a szerkezetben csak kis konformációváltozások valósulnak meg, így az előbb említett stabilizáló hidrogénkötések nagy része megmaradhat. Továbbá, mivel az aktív helyről nem távozik el a C-terminális termék, ezért a proteáz és az inhibitor C-terminális terméke között megmaradnak a

hidrofób kölcsönhatások. Így a vízmolekula nem fér oda a katalitikus triádhoz, tehát az inhibitor N-terminális terméke és a proteáz közötti észterkötés nem tud felbomlani. Mivel nagyon rigid a hasítatlan inhibitor hurok, így hasítás után a flexibilitás növekedése entrópiánövekedéssel jár, ami kompenzálja a hasításkor bekövetkezett pozitív entalpiaváltozást [5]. Egy eredetileg is mozgékony hurok flexibilitása nem képes annyira megnőni, hogy kompenzálja a hasítás következtében megnőtt entalpiát. A stabil hasított inhibitor-proteáz komplexben a kötés reszintézise energetikailag kedvezőbb, mint a komplex szétválása.

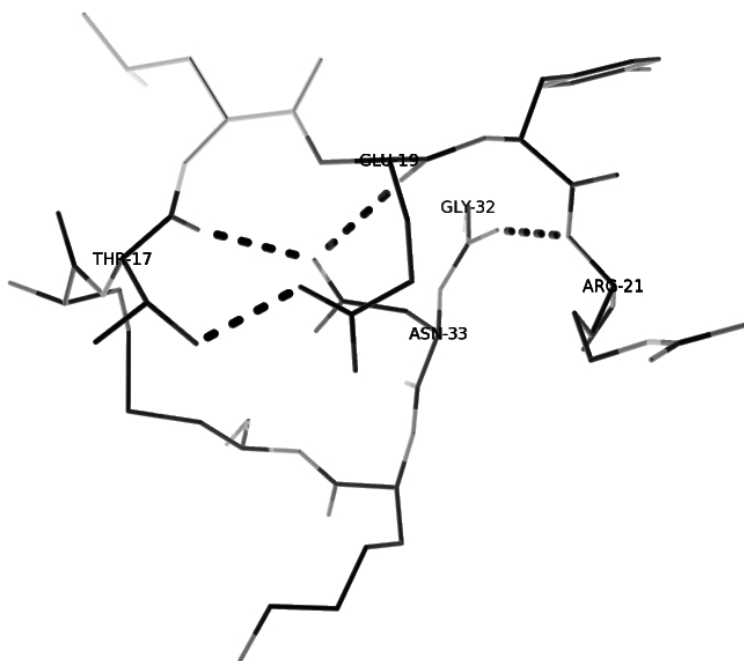
Kutatók létrehoztak olyan inhibitorokat, amelyekben a hurok régió aminosavait megtartották, az inhibitor vázba viszont mutációkat vittek be, amiktől megnőtt az inhibitor hurok mozgékonyága. Ezek a molekulák inkább szubsztrátként viselkedtek, mint inhibitoroként [6]. Ebből is látszik, hogy mennyire fontos az inhibitor hurok rigiditása.

Az inhibitor hurok stabilizálása

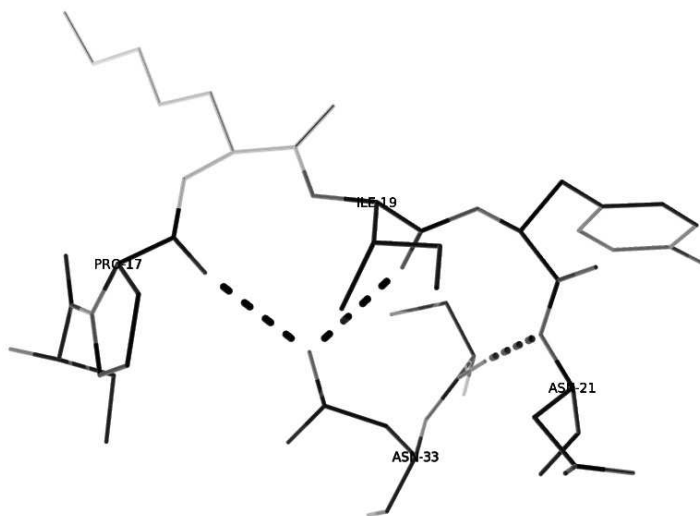
Hogyan képesek az egyes reverzibilis szerin proteáz inhibitorok egy merev, meghatározott konformációba helyezni a reaktív hurkot? A különböző családokba tartozó inhibitorok különböző vagy hasonló mechanizmusokkal biztosítják-e a közel azonos hurok-konformációt? Irodalmi adatok alapján bizonyos inhibitor családokat vizsgáltam, azt találtam, hogy vannak általános, több családra is jellemző hurok-stabilizáló stratégiák.

A hurok stabilizálásában különösen fontos szerepe van a váz és a hurok között kialakuló diszulfidhidaknak, mivel ezek kovalens, elsőrendű kötések. Az *Ascaris* és *Pacifastin* családban 2–2 diszulfidhíd stabilizálja a reaktív hurkot, míg a *Kazal* és *Kunitz-BPTI* családban 1–1 diszulfidhíd. A diszulfidhidak a hurok régió közelébe helyezik a váz egy adott peptid szakaszát, amely a reaktív hurokkal további, például hidrogénhidas kölcsönhatások kialakítására lesz képes.

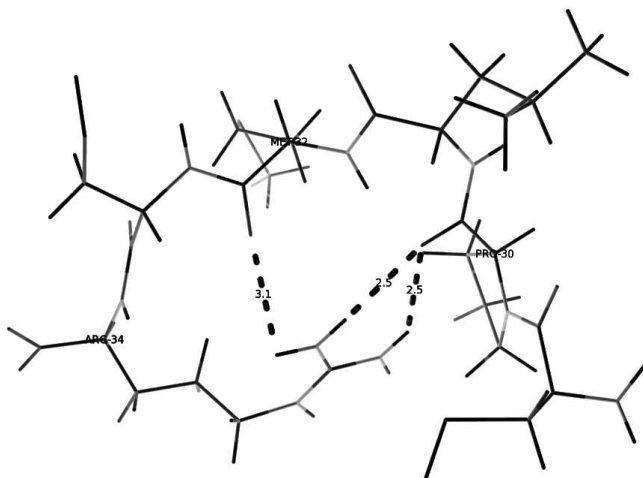
A hurok konformáció kialakításában fontos szerepe van mind a hurkon belüli, mind a hurok és váz közötti hidrogénkötéseknek. Felhívnom a figyelmet a P1' és P2 aminosavak egymással és más aminosavakkal kialakított hidrogénkötéseire, amelyeknek feltehetőleg az a szerepük, hogy biztosítsák a P1-es aminosav „well-exposed”, az inhibitor váztól elfele néző helyzetét, ugyanis ez a két aminosav a közvetlen szomszédja a kiemelt jelentőségű P1-es aminosavnak. Az *Ascaris* családba tartozó inhibitorok nagy részében, a *Potato* inhibitor 1 családba tartozó CI-2-ben [7] és más családok egy-egy képviselőiben is megtalálható egy főlánc-főlánc hidrogénkötés a P1' és P2-es aminosavak között. Az *Ascaris* családba tartozó inhibitorok többségében ezenfelül még oldallánc-oldallánc hidrogénkötés is található a P1' és P2 aminosavak között [5]. Ez a kötés szintén megtalálható a *Kazal* családba tartozó ovomucoid inhibitorban is (4. ábra).



4. ábra: a pulyka ovomucoid 3. doménjének a hurok régiója és a stabilizálásban fontos hidrogénkötések láthatók. Az ábrán látszik a P1' és P2 közötti oldallánc-oldallánc hidrogénkötés és a P1', illetve a P2 hidrogénkötése a váz egy aszparagin aminosavával. (A szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket jelölik.)



5. ábra: a vaddisznó SPINK-1 hurok régiója és a stabilizálásban fontos hidrogénkötések láthatók. Az ábrán látszik a P1' és P2 hidrogénkötése a váz egy aszparagin aminosavával. (A szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket jelölik.)



6. ábra: a C/E-1 inhibitor hurok régiója és a stabilizálásban fontos hidrogénkötések láthatók. Az ábrán látszik a P1' és P2 hidrogénkötése a váz egy arginin aminosavával. (A szaggatott vonalak a hidrogénkötéseket jelölik.)

Sokszor a P1'-es és P2-es aminosav, illetve a váz egy adott aminosava között alakul ki hidrogénkötés. A váz egy adott aminosava így egymáshoz képest rendezi a P1' és P2-es aminosavakat, hogy a végén a P1-es aminosav jól hozzáférhető, „well-exposed” helyzetbe kerüljön. A Kazal család több tagjában is megtalálható két hidrogénhid, az egyik a P1' aminosav és a váz egy aszparaginja között, a másik pedig az előbb említett aszparagin és a hurok P2-es aminosava között (4. és 5. ábra) [5]. Ugyanilyen szerepe van az *Ascaris* családba tartozó C/E-1 (Chymotrypsin/elastase inhibitor) inhibitor egy, a vázhoz tartozó arginin aminosavának (ld.: 6. ábra). A Pacifastin családba tartozó SGCI (*Schistocerca gregaria* chymotrypsin inhibitor) inhibitorban a P1' aminosav egy aszparagin aminosavval alakít ki hidrogénkötést, míg a P2-es csoport a váz egy treoninjával. A Kunitz-BPTI családba tartozó BPTI-ben (Bovine pancreatic trypsin inhibitor) a P1' aminosav és a váz egy glicinje között alakul ki hidrogénkötés.

Egy meghatározott hosszúságú hurok-konformáció létrehozásához nem csak egy bizonyos peptidszakasznak az inhibitor vázból történő kiemelésére van szükség, hanem a hurok melletti régióknak az inhibitorváz síkjában tartására is. Valószínűleg ezért az inhibitorokban általánosan megtalálható a huroktól P' irányban egy béta-lemez, aminek több esetben már a P3' aminosav is tagja. Továbbá több inhibitorban is megtalálhatók a hurok melletti régiók hidrogénkötései, például az AcAPc2 (*Ancylostoma caninum* anticoagulant peptid c2) inhibitorban a P4-es aminosav és a P7-es között.

Következtetés

A reaktív hurok kimerevítésére sok megoldás létezik, viszont a meglehetősen kevés inhibitor család vizsgálata során is már azt találtam, hogy léteznek közös hurok-stabilizáló motívumok.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a téma átlátásában nyújtott segítséget Dr. Pál Gábornak (ELTE TTK Biokémia Tanszék) és Szakács Dávidnak (ELTE TTK Biokémia Tanszék).

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Laskowski M. Jr., Kato I.; *Annual Review of Biochemistry* **49**, 593–626., 1980
- [2] Apostoluk W., Otlewski J.; *Proteins* **32**, 459–474., 1998
- [3] Otlewski J., Jaskólski M., Buczek O., Cierpicki T., Czapińska H., Krowarsch D., Smalas A. O., Stachowiak D., Szpineta A., Dadlez M.; *Acta Biochimica Polonica* **48**, 419–428., 2001
- [4] Krowarsch D., Cierpicki T., Jelen F., Otlewski J.; *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 2427–2444., 2003
- [5] Song J., Markley J. L.; *Biochemistry* **42**, 5186–5194., 2003
- [6] Mucsi Z., Orosz Gy., Perczel A.; *Biokémia* **4**, 79–86., 2003
- [7] Cierpicki T., Bania J., Otlewski J.; *Protein Science* **9**, 976–984., 2000